



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

Instituto de Ciencias  
Centro de Agroecología

Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS A PARTIR DEL  
COMPLEJO BACTERIANO DE *Apis mellifera* Y SU EFECTO  
CONTRA *Atta mexicana* Y *Sitophilus zeamais*.

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO

DE

Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

PRESENTA:

Fanny Badillo Perez

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RIVERA TAPIA.

Puebla, Pue.

Septiembre, 2015

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 <i>Apis mellifera</i> y su papel en la agricultura .....	4
3.1.1 Microorganismos asociados a <i>Apis mellifera</i> .....	4
3.1.2 <i>Spiroplasmas</i> sp.....	5
3.2 Plagas agrícolas .....	5
3.3 Generalidades de la hormiga Arriera <i>Atta mexicana</i> .....	6
3.4 Generalidades de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	7
3.5 Metabolitos secundarios como alternativa biotecnológica en el control de plagas. ....	8
3.5.1 Metabolitos secundarios.....	9
4. OBJETIVOS .....	10
4.1 Objetivo General .....	10
4.2 Objetivos particulares.....	10
5 HIPÓTESIS .....	10
6 METODOLOGÍA .....	11
6.1 Muestreo del material biológico.....	11
6.2 Aislamiento bacteriano en <i>Apis mellifera</i> .....	12
6.3 Identificación de las bacterias aisladas.....	13
6.4 Detección de <i>Spiroplasmas</i> sp.....	15
6.5 Producción y extracción de metabolitos.....	16
6.6 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los extractos contra <i>Atta mexicana</i> .....	16
6.7 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los metabolitos secundarios provenientes de <i>Yersinia</i> contra <i>Atta mexicana</i> .....	18
6.7.1 Análisis estadístico .....	20
6.8 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los extractos contra <i>Sitophilus zeamais</i> .....	20
6.8.1 Determinación del contenido de humedad en maíz <i>Cacahuazintle</i> .....	20
6.8.2 Cría de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	20
6.8.3 Aplicación y evaluación <i>in vitro</i> de los extractos sobre <i>S. zeamais</i> .....	21
6.8.4 Mortalidad de los adultos .....	22
6.8.5 Pérdida de peso.....	23
6.8.5.1 Análisis estadístico de los resultados .....	23
6.9 Determinación del perfil proteico.....	23

7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1	Identificación de géneros bacterianos .....	24
7.2	Detección del género <i>Spiroplasma</i> .....	25
7.3	Microscopía de fuerza atómica.....	27
7.4	Extracción de los metabolitos secundarios.....	29
7.5	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los extractos contra <i>Atta mexicana</i> .....	29
7.6	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de los extractos contra <i>Sitophilus zeamais</i> .....	30
7.6.1	Determinación del porcentaje de humedad .....	30
7.6.2	Mortalidad de los adultos .....	31
7.6.3	Determinación de pérdida de peso .....	31
7.7	Determinación y diversidad de los perfiles proteicos de los extractos.....	32
7.7.1	Actividad insecticida de los aislados.....	34
8	CONCLUSIONES .....	36
9	RECOMENDACIONES .....	37
10	LITERATURA CITADA.....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación de Santa María Coronango, Puebla México. ....	
Figura 2. Colmenares ubicados en Santa María Coronango Puebla, México. ....	12
Figura 3. Siembra por estría en Agar nutritivo. ....	13
Figura 4. Interpretación de las galerías API de cada una de las pruebas bioquímicas. ....	14
Figura 5. Producción y extracción de metabolitos secundarios a partir de <i>A. mellifera</i> . ....	16
Figura 6. Distribución de los tratamientos contra <i>Atta mexicana</i> en las unidades experimentales. ....	17
Figura 7. Evaluación <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios. ....	18
Figura 8. Distribución de los tratamientos contra <i>Atta mexicana</i> en las unidades experimentales. ....	19
Figura 9. Evaluación <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios provenientes de <i>Yersina</i> . ....	19
Figura 10. Distribución de los tratamientos contra <i>Sitophilus zeamais</i> en las unidades experimentales. ....	22
Figura 11. Unidades experimentales en el tratamiento contra <i>Sitophilus zeamais</i> . ....	22
Figura 12. Gel de Agarosa que muestra la amplificación del gen 16S ARNr. ....	26
Figura 13. Árbol filogenético, mostrando la relación filogenética entre los miembros del género <i>Spiroplasma</i> . ....	27
Figura 14. Microscopía de fuerza atómica de muestra positiva a <i>Spiroplasma</i> , mostrando topografía. ....	28
Figura 15. Microscopía de fuerza atómica de muestra positiva a <i>Spiroplasma</i> mostrando diferencia de fases. ....	28
Figura 16. SDS-PAGE al 10% de los extractos ....	33

## Índice de tablas

Tabla 1. Pruebas bioquímicas del sistema de galerías API 20 E <sup>TM</sup> (BIOMERIUX) .....	
Tabla 2. Tratamientos utilizados en el control de <i>Atta mexicana</i> .....	17
Tabla 3. Tratamientos utilizados en el control de <i>Atta mexicana</i> .....	19
Tabla 4. Tratamientos utilizados en el control de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	21
Tabla 5. Géneros bacterianos aislados a partir de <i>Apis mellifera</i> .....	24
Tabla 6. Evaluación del porcentaje de mortalidad por parte de los tratamientos contra <i>A. mexicana</i> .....	29
Tabla 7. Porcentaje de humedad en granos de maíz <i>Cacahuazintle</i> .....	30
Tabla 8. Porcentaje promedio de mortalidad de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	31
Tabla 9. Pérdida de peso en maíz <i>Cacahuazintle</i> .....	32

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Toda agricultura antes del desarrollo de los agrotóxicos sintéticos, se puede considerar como una agricultura biológica, pero a medida que progresa el conocimiento y se modernizan los sistemas de producción agrícola, los principios ecológicos son fácilmente ignorados, lo que provoca que los sistemas agrícolas sean inestables; esta inestabilidad se ve reflejada en el surgimiento de plagas agrícolas y enfermedades en los cultivos (Altieri y Nichols, 1994), lo que ocasiona importantes reducciones en el rendimiento y pérdidas económicas millonarias a nivel mundial (Hadacek y Greger, 2000). En México son frecuentes e importantes los daños que causan las plagas en plantas cultivadas y productos agrícolas almacenados. Estudios recientes revelan que las pérdidas causadas por hormigas del género *Atta*, mejor conocidas como hormigas corta hojas, son consideradas como una de las plagas agrícolas de mayor importancia en las regiones neotropicales (Bertorelli *et al.*, 2006). En cuanto a pérdidas postcosecha por plagas Throne (1994) ha reportado mermas de hasta un 80% en regiones de clima húmedo, siendo el gorgojo de maíz, *Sithophilus zeamais* una de las principales plagas que causan este daño en las regiones tropicales y subtropicales (Vergara, 1994).

Ante esta problemática se ha hecho uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos, siendo esto un síntoma de la crisis ambiental que afecta a la agricultura. Sin embargo, el costo indirecto del uso de plaguicidas por los daños al ambiente y a la salud pública debe ser balanceado contra estos beneficios (Altieri y Nicholls, 2000). Por lo que durante los últimos años las tendencias hacia la búsqueda de una agricultura sustentable y la creciente preocupación pública acerca de los riesgos asociados a los pesticidas sintéticos, ha derivado en tecnologías que incluyen el uso de organismos naturales o modificados, sus genes, el producto de sus genes (Thomashow y Weller, 1996), así, como compuestos bioactivos (metabolitos secundarios); producto de estos organismos que reduzcan el efecto indeseable en plantas o animales, representando así, alternativas biotecnológicas (García *et al.*, 2012), que pueden ser más efectivas, biodegradables y con menor toxicidad para los organismos que no son blanco (Pushpalatha y Muthukrishnan, 1999; Liu *et al.*, 2001; Tasao *et al.*, 2002; Nathan, 2006). En este contexto se le puede considerar a la abeja *Apis mellifera* como fuente potencial de compuestos bioactivos al albergar en su organismo una alta carga bacteriana capaz de producir metabolitos secundarios con actividades variadas (Omura, 1992), como respuesta a la competitividad natural que se observa en los diferentes ambientes en que este polinizador tiene incidencia (Martinson *et al.*, 2011), así como de las

interacciones con otras poblaciones, siendo las bacterias capaces de producir dichos compuestos no solo para su propia defensa, sino también para el de su hospedero (Colwell, 2002). En este sentido, dada la gran diversidad de bacterias provenientes de diversas fuentes, es que resulta de interés, en el campo de la agricultura sustentable, la identificación y caracterización de dichas bacterias como agentes de biocontrol, mediante la producción de sus compuestos bioactivos, (Manzi y Mayz, 2003).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los daños causados por insectos en la agricultura han derivado en una importante disminución en la calidad de los cultivos, rendimiento y pérdidas económicas. Por lo que esta situación ha conllevado al uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos que han buscado mitigar los impactos negativos sobre los cultivos, pero sin considerar la presión y desequilibrio que están ocasionando sobre los ecosistemas.

Por lo cual es necesario orientar investigaciones hacia nuevas alternativas biotecnológicas, enfocadas al control de plagas y enfermedades que conlleven a la disminución de la adquisición de insumos externos en los agroecosistemas, encuadrando los sistemas productivos dentro de una agricultura sostenible que produzca alimentos sanos, suficientes y de calidad de una manera rentable, socialmente aceptable y sin dañar el ambiente (Altieri y Nichols, 1994). Una de estas alternativas son los productos metabólicos de aislamientos bacterianos provenientes de diferentes sustratos (Sierra *et al.*, 2012). Por lo que este proyecto abarcará tanto el aislamiento de bacterias presentes en todo el organismo de la abeja *A. mellifera*, dado que al ser un polinizador natural, es portador de una gran diversidad de microbiota representando un vector de dispersión de la misma, así, como la extracción de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias encontradas y la evaluación de su actividad insecticida contra *Atta mexicana* y *Sitophilus zeamais*, por ser considerados unas de las principales plagas en plantas cultivadas y producto almacenado, respectivamente, aportando así valiosa información en el campo de los métodos alternativos de control.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 *Apis mellifera* y su papel en la agricultura

La abeja *A. mellifera* es un polinizador natural considerado directa o indirectamente esencial en la producción de alimentos, ya que aproximadamente tres cuartas partes de los cultivos en todo el mundo dependen de la polinización para producir semillas, frutas y vegetales, promoviendo ya sea la cantidad de rendimiento o la calidad de los cultivos (Klein *et al.*, 2007; Williams, 1994). Por lo que el desarrollo de la apicultura ofrece un gran beneficio en términos de polinización, ya que favorece el sostenimiento de los ecosistemas, la conservación de especies y genera incrementos de hasta un 60% en los rendimientos de los cultivos agrícolas, que son beneficiados por las visitas de las abejas (Echazarreta y Cajero, 2002). Sin embargo, este servicio está ahora en peligro crítico por la disminución de la apicultura debido a la pérdida de los subsidios, la intoxicación por insecticidas, la introducción de plagas y presencia de microorganismos patógenos en abeja (*A. mellifera*), utilizando a esta como vector dispersor de enfermedades como la causada por *Spiroplasma melliferum* (Clark, 1977; Heather *et al.*, 2012; Corby *et al.*, 2014), surgiendo así la importancia del buen cuidado y manejo de esta especie insectil.

Además de las enfermedades causadas por las diferentes plagas que atacan a las propias abejas, ocasionando pérdidas en la producción, el mayor problema radica en los métodos de control utilizados por los productores, los cuales consisten en la aplicación de químicos sintéticos que dejan residuos y disminuyen la calidad de la miel, por lo que se ha intentado realizar aislamientos de microorganismos patógenos de las abejas infectadas y microorganismos de abejas sanas, y desarrollar pruebas de antagonismo in vitro entre microorganismos causales de enfermedades y microorganismos no patógenos (Sánchez, 2003).

##### 3.1.1 Microorganismos asociados a *Apis mellifera*

Los estudios realizados sobre microorganismos asociados con *A. mellifera* se han centrado en el contenido del tracto gastrointestinal, identificando básicamente bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Clostridium*, además de hongos y levaduras (Kacániová *et al.*, 2004; Jeyaprakash *et al.*, 2005).

### 3.1.2 *Spiroplasmas* sp

Los *Spiroplasmas* sp., han sido bien documentados en una amplia gama de huéspedes y como agentes causantes de varias enfermedades de plantas e insectos (Gasparich, 2002).

Bové (1997), describe a los *Spiroplasmas* como mollicutes caracterizados por la motilidad y morfología helicoidal. Estos fueron descubiertos a través de estudios sobre el enanismo del maíz y de las enfermedades presentes en cítricos, donde el patógeno de cítricos ha sido conocido como *Spiroplasma citri* desde 1973, y el agente del achaparramiento del maíz que se cultivó en 1975 y fue totalmente caracterizado como *Spiroplasma kunkelii* para 1986. La tercera especie fitopatógeno es *Spiroplasma poeniceum*, cultivado a partir de plantas de bígaro infectados naturalmente en Siria y descrito en 1986. Siguiendo el trabajo pionero sobre *Spiroplasma citri* y *Spiroplasma kunkelii*, cerca de otras cincuenta especies de *Spiroplasmas* han sido descubiertas, en donde todos han sido aislados de insectos, garrapatas y plantas. Los insectos son particularmente fuentes ricas de estas bacterias, donde algunos derivados de insectos son entomopatógenos, como *S. melliferum* y *Spiroplasma apis* que son patógenos de las abejas melíferas.

Otras especies como *Spiroplasma floricola* es el agente de la enfermedad de letargo de *Melolontha* (abejorro). *Spiroplasma poulsonii* infecta las especies neotropicales de *Drosophila*, que se transmite transováricamente y mata a la descendencia masculina de una mosca hembra infectada. Algunos *Spiroplasmas* derivados de insectos también se encuentran en las superficies de las planta, como *S. apis* que se ha cultivado a partir de las superficies de flores de cultivo en las proximidades de colmenas afectadas, lo que sugiere que los *Spiroplasmas* presentes en las superficie de las plantas se depositan sobre estas por los insectos contaminados.

### 3.2 Plagas agrícolas

Las nuevas tendencias mundiales en relación a la agricultura, como lo son la agricultura intensiva con una tendencia clara hacia el monocultivo y la facilidad que proporciona el uso de productos químicos ha desencadenado en la ruptura del balance natural, amenazando la sostenibilidad y la calidad de las cosechas ocasionando que algunas especies insectiles alcancen la condición de plaga (Meehan *et al.* 2011), y constituyan un factor limitante de producción. Helmuth (2000), calcula que la perdida causada por plagas insectiles a nivel mundial es del 10% al 30%, y junto con otras plagas y enfermedades el daño aumenta cerca del 40 a 48 %.

Desde el inicio de la agricultura, las plagas agrícolas han representado verdaderos competidores para el ser humano. En un principio los sistemas de control consistían en prácticas físicas y culturales (Altieri, 1991), pero a medida que el ser humano evoluciono, y la necesidad de prevenir las pérdidas causadas por plagas aumento, las medidas tradicionales de control resultaron ineficaces, lo que condujo a la lucha contra las plagas mediante la creación y utilización de plaguicidas sintéticos (Blanchi *et al.* 2006).

### **3.3 Generalidades de la hormiga Arriera *Atta mexicana***

Las hormigas cortadoras de hojas (*Atta* spp.) son conocidas comúnmente como hormigas podadoras, arrieras, forrajeras o corta hojas; se diferencian de los otros géneros de hormigas *Attini* porque cortan material vegetal para el cultivo del hongo *Leucocoprinus* spp, que es su principal alimento y con el cual desarrollaron una relación simbiótica. La hormiga arriera *A. mexicana*, causa grandes pérdidas en los trópicos al defoliar ajonjolí, algodón, cacahuete, cafeto, cebolla, chile, cítricos (lima, limón, mandarina), frijol, jamaica, maíz, papayo, plátano, trigo, vid, yuca y plantas de ornato (Bravo, 1959; Metcalf y Flint, 1976), esta especie se distribuye desde Arizona, México, Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras y hasta el norte de Nicaragua (Maes y Mackay, 1993; Della, 2003). En México tiene presencia en 19 estados Aguascalientes, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Veracruz (Rojas, 2001). A pesar de que el trabajo de estos insectos es ecológicamente importante porque remueven suelo, promueven la ventilación, aportan materia orgánica y mejoran la estructura del suelo, su alto impacto como podadores y difícil manejo hace que se les considere como una plaga importante en los sistemas agrícolas y silvopastoriles en varios países de América Latina (Della, 2003; Fowler *et al.*, 1990), sin embargo estudios revelan que aunque las pérdidas causadas por esta plaga son de gran magnitud, no se cuenta con registros sistematizados por país o región (Escobar *et al.*, 2002).

Los métodos convencionales de control de hormigueros corta hojas, consisten en actividades mecánicas y culturales, así como echar diesel o kerosén a los castillos subterráneos, dinamitarlos, arrojar cantidades de insecticidas sintéticos y tóxicos a la tierra, que resultan ser además de ineficientes, poco adecuados para exterminarlos (Della, 2003). Debido a esto se han realizado investigaciones de nuevas alternativas biotecnológicas como lo son el uso de con controladores biológicos como hongos antagonistas, entre ellos: *Trichoderma viride*, entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria*

*bassiana* (Escobar *et al.*, 2002, Pérez, 2002). Además, se han evaluado extractos de metabolitos producto de estos hongos, enfocados principalmente en la búsqueda de actividad insecticida (Gruber y Valdix, 2003; Caffarini *et al.*, 2008).

### **3.4 Generalidades de *Sitophilus zeamais***

El gorgojo del maíz *S. zeamais*, es un coleóptero perteneciente a la familia Curculionidae. Fue descrito por Motschulsky en 1855, como aclaración a la clasificación hecha por Linnaeus en 1763 del *S. oryzae*. Muchos autores relacionan *S. zeamais* y *S. oryzae* como una especie; pero en 1961 Kuschel propuso diferenciar ambas especies por medio de su genitalia. Es originario de la India, pero ha sido encontrado en Europa y en regiones tropicales del mundo entero. Es una especie distribuida extensamente en los trópicos y subtrópicos, presente en países como Brasil, México, Colombia, Venezuela, Perú y Chile (Andrews y Quezada, 1989). *S. zeamais* tiene gran capacidad de vuelo, lo que le permite infestar los granos desde el campo. Ataca todo tipo de cereal, siendo extraordinariamente destructivo, por lo que de las plagas asociadas a los granos almacenados, *S. zeamais* se considera la que más daño puede provocar (Arienilmar *et al.*, 2005).

Las hembras horadan el grano y depositan en cada diminuta perforación un huevecillo que posteriormente es cubierto con una secreción, por lo que su presencia pasa inadvertida. Cada hembra deposita de 300 a 400 huevos que tardan entre cuatro y seis semanas en transformarse en adultos. La larva, carente de patas, se alimenta, se transforma en pupa y finalmente en adulto, dentro del grano. El adulto vive de cuatro a cinco meses. La hembra alcanza su máxima actividad de oviposición después de tres semanas de haber emergido. (Arias y Dell'Orto, 1983).

Los métodos convencionales de control están basados en la utilización de pesticidas sintéticos, sin embargo actualmente ya no constituyen un método eficaz, dado que estos compuestos químicos suelen ser altamente tóxicos y tener un espectro bastante amplio, además, pueden generar problemas de residualidad en los alimentos en los cuales han sido utilizados (Vergara *et al.*, 2000). Además de que la mayoría resultan poco accesibles para ser usados por los medianos y pequeños productores (Pérez *et al.*, 2007). Por lo que en los últimos años, se ha hecho uso de alternativas dentro del manejo integrado de plagas como son la utilización de metabolitos secundarios producto de plantas como *Chenopodium ambrosioides* L. y *Peumus boldus* Mol, considerándoles sustancias ecológicamente eficaces (Pérez y Vázquez 2001; Silva *et al.*, 2005)

### **3.5 Metabolitos secundarios como alternativa biotecnológica en el control de plagas.**

El control biológico es una de las técnicas preferibles aplicadas al control de plagas, debido a sus ventajas ambientales, y consiste en la utilización de organismos vivos en el tratamiento de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, buscando la disminución de la densidad de una población o el impacto de un organismo plaga (Jacas *et al.*, 2005), para este tipo de control se ocupan desde organismos microbiológicos como artrópodos hasta microbiológicos como bacterias. Mucho antes del descubrimiento de los microorganismos, estos ya eran explotados para intereses humanos tales como la preservación de alimentos, la conversión de azúcar a alcohol por levaduras para la elaboración de cerveza en Sumeria y Babilonia, la utilización de levaduras para la panadería en Roma en el año 100 a de C., la fermentación de vino 3,500 a de C., entre otras prácticas (Demain y Fang, 2000). Pero no fue sino hasta 1870 que Tyndall, Pasteur y Roberts por separado, observaran el efecto antagónico de algunos microorganismos sobre otros, y en 1929 Alexander Fleming dio paso a una nueva era mediante la publicación de sus estudios acerca de la sustancia activa conocida como penicilina, hallazgo que dio a lugar al primer agente exitoso químico terapéutico producido por un microorganismo (Demain y Elander, 1999). De esta forma, durante los últimos 50 años los metabolitos secundarios han sido estudiados con el fin de obtener productos microbianos manufacturados comercialmente, dentro de los cuales los antibióticos son los considerados de mayor importancia, ya que han constituido la principal herramienta en el control de enfermedades causadas por bacterias (Demain y Sanchez 2009). En el campo de la agricultura, los factores biológicos que influyen en la productividad, rendimiento económico y calidad de los cultivos, así como la búsqueda de una agricultura sostenible, ha dado énfasis al estudio e innovación de métodos naturales de protección (Földes *et al.*, 2000), tal es el caso de varios miembros del género *Bacillus*, que producen diversas sustancias antimicrobianas (metabolitos secundarios) que muestran actividad antibacteriana y/o antifúngica frente a fitopatógenos y patógenos de origen alimentario (Katz y Demain 1977; Shoji, 1978). Como ejemplo particular se ha demostrado la actividad insecticida por parte de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda*, mejor conocido como gusano cogollero del maíz (Arango *et al.*, 2002).

### **3.5.1 Metabolitos secundarios**

Como mencionan Demain y Fang (2000), los metabolitos son aquellos compuestos químicos de Carbono aislados de diversos seres vivos, y que derivan del metabolismo primario o secundario de los organismos vivos. Los mismos autores citan que los metabolitos primarios, están conformados por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y ácidos grasos, siendo comunes en todos los sistemas biológicos. Los metabolitos secundarios presentan bajo peso molecular, de naturaleza química y taxonómicamente diversa; cuya particularidad consiste en la regulación del crecimiento o inhibición del ciclo de vida de células procariotas o eucariotas a nivel bioquímico. Por lo que los metabolitos secundarios se han usado en aplicación biotecnológica como: (i) como armas competitivas utilizados contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas, insectos, y animales de gran tamaño, (ii) como agentes de transporte de metal, (iii) como agentes de simbiosis entre microbios y plantas, nematodos, insectos y animales superiores, (iv) como hormonas sexuales y (v) como efectores de diferenciación.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar la actividad de metabolitos secundarios producidos por bacterias aisladas a partir de *Apis mellifera* contra *Atta mexicana* y *Sitophilus zeamais* in vitro.

### **4.2 Objetivos particulares**

- 4.2.1 Aislar e identificar Enterobacterias y Spiroplasmas a partir de *A. mellifera*.
- 4.2.2 Obtener productos metabólicos secundarios provenientes de las Enterobacterias aisladas.
- 4.2.3 Evaluar los extractos contra *A. mexicana* y *S. zeamais* en condiciones controladas de temperatura y humedad.

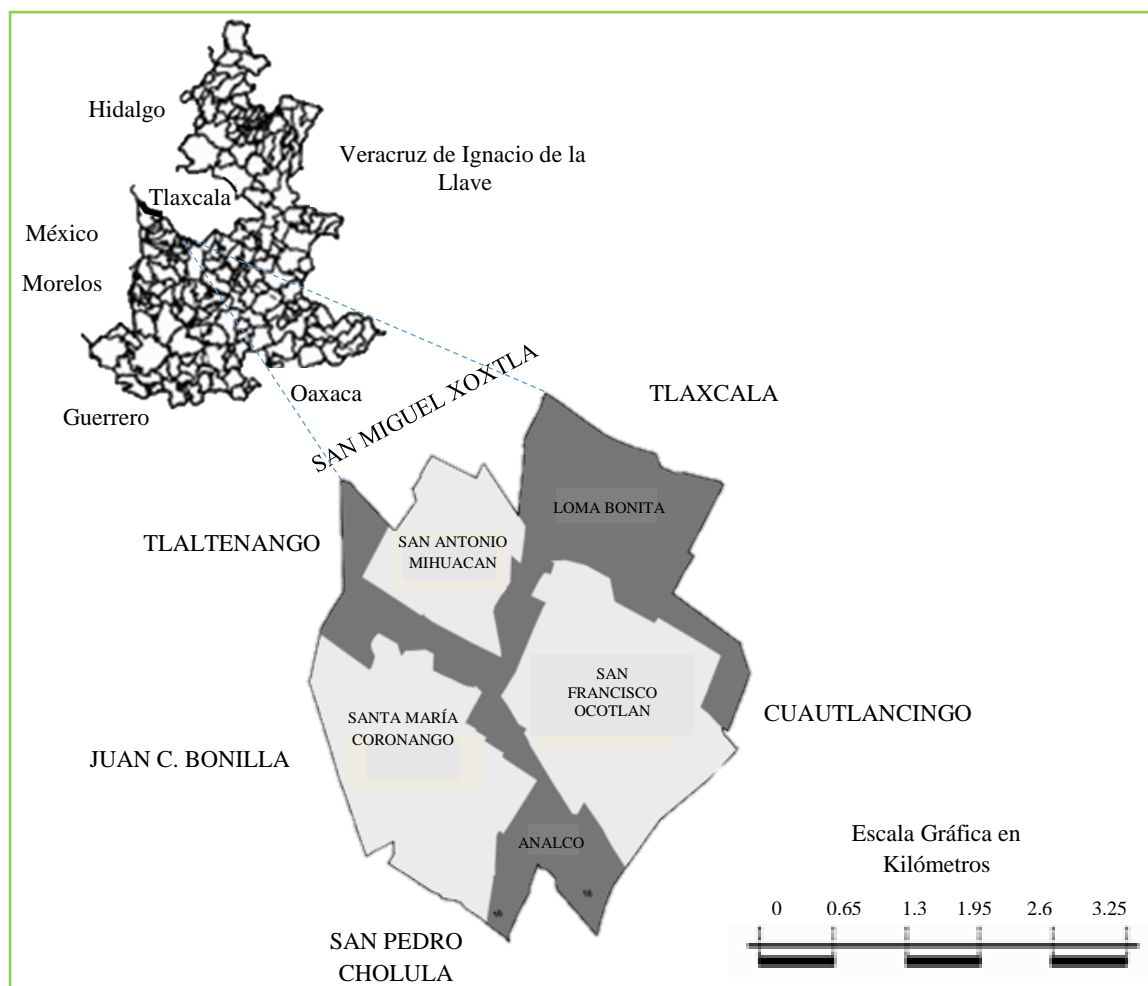
## **5 HIPÓTESIS**

La microbiota natural presente en *Apis mellifera* representa una fuente promisoras de sustancias bioactivas contra *Atta mexicana* y *Sitophilus zeamais* a una significancia de  $P < 0,05$ .

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Muestreo del material biológico

Los ejemplares de *A. mellifera* fueron obtenidos de colmenares ubicados en Santa María Coronango, Puebla, México. Dicha comunidad se encuentra ubicada entre los paralelos 19° 06' y 19° 10' de latitud norte; los meridianos 98° 15' y 98° 20' de longitud oeste; altitud entre 2 180 y 2 200 m. Colinda al norte con el municipio de San Miguel Xoxtla y el estado de Tlaxcala; al este con el estado de Tlaxcala y el municipio de Cuautlancingo; al sur con los municipios de Cuautlancingo, San Pedro Cholula y Juan C. Bonilla; al oeste con los municipios de Juan C. Bonilla, Tlaltenango y San Miguel Xoxtla (Figura 1). El clima predominante es templado subhúmedo con lluvias en verano. Cuenta con un rango de temperatura que oscila entre los 14 °C y los 18 °C y una precipitación que varía entre los 800 – 1000 mm (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2009).



**Figura 1.** Mapa de ubicación de Santa María Coronango, Puebla México.

El muestreo se realizó del 13 de Enero al 12 de Mayo del 2014 de forma aleatoria en el apiario que consta de 30 colmenas (Figura 2), tomando el 10% del total de las cajas

presentes por muestreo semanal, bajo el siguiente procedimiento, se localizaron las colmenas a muestrear, con la ayuda de un ahumador se abrió la caja y se tomaron un total de 30 abejas por cada muestreo. Se tomaron con una pinza estéril y almacenaron en un frasco igualmente estéril etiquetado. Se transportaron lo más pronto posible a forma de mantener a los ejemplares vivos al laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias (CICM-ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su procesamiento.



**Figura 2.** Colmenares ubicados en Santa María Coronango Puebla, México.

### **6.2 Aislamiento bacteriano en *Apis mellifera***

El aislamiento de colonias bacterianas se realizó mediante el procesamiento de siete ejemplares vivos de *A. mellifera*, las cuales se colocaron durante un minuto a una temperatura de 4° C, esto con el fin de disminuir sus funciones y procesarlos vivos. A continuación se resuspendieron en 10 ml de caldo nutritivo y se maceraron con la ayuda de un mortero, realizando alícuotas en tubos independientes e incubaron a 30° C durante 24 horas, en seguida se realizaron diluciones decimales a partir de esta muestra y se sembraron en agar nutritivo por estría 20 µl de cada dilución, incubándose a 30° C, 24 horas (Figura 3). Del total de colonias se lograron aislar un total de 17 cepas morfológicamente diferentes.



**Figura 3.** Siembra por estría en Agar nutritivo.

### **6.3 Identificación de las bacterias aisladas**

Los 17 aislamientos se identificaron por medio del sistema de galerías API 20 E™ (20 100/20 160 BIOMERIUX), que es un sistema de pruebas bioquímicas que permiten la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos, pudiendo identificar 108 géneros y 104 especies de estas bacterias. La galería API 20E consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados de 23 pruebas bioquímicas tradicionales estandarizadas y miniaturizadas (Tabla 1) y una base de datos (Bio-mériux, 1989). Cada una de las 17 cepas aisladas en agar nutritivo se inocularon en 5 mL de caldo nutritivo, logrando una suspensión por cepa, la cual se incubó por 18 horas a 30 °C. Pasado este lapso se tomaron 20 µL de la suspensión de bacterias y se inocularon en cada uno de los 20 pocillos. Para el caso de las pruebas CIT (Utilización del citrato), VP (Producción de acetoina, Voges-Proskauer) y GEL (Gelatinasa), se llenó la cúpula de los pocillos con la suspensión de bacterias, y para el caso de las pruebas ADH (Arginina deshidrolasa), LDC (Lisina descarboxilasa), ODC (Ornitina descarboxilasa), URE (Ureasa) y H<sub>2</sub>S (Producción de H<sub>2</sub>S), se cubrió con parafina las cúpulas de los pocillos para obtener anaerobiosis. Se colocó agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda y se incubaron por 24 horas a 30° C.

**Tabla 1.** Pruebas bioquímicas del sistema de galerías API 20 E™ (20 100/20 160 BIOMERIUX) de galerías API 20 E™, BUAP, 2015.

Prueba	Reacción / Enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización del citrato
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoína (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
INO	Fermentación/oxidación de inositol
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

Con el objetivo de lograr una mejor identificación se realizaron las pruebas de oxidasa y lactosa de forma independiente, para después proceder a la lectura. La lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura (Figura 4), obteniendo un perfil numérico de 7 cifras. Cada perfil numérico fue introducido en el Software de identificación API®, APIWEB™.



**Figura 4.** Interpretación de las galerías API de cada una de las pruebas bioquímicas. Laboratorio de Microbiología, ICUAP, 2014.

#### 6.4 Detección de *Spiroplasmas* sp

Los *Spiroplasmas* se obtuvieron a partir de siete ejemplares de *A. mellifera* que se resuspendieron en 10 mL de caldo SP-4, y se maceraron con ayuda de un mortero, realizando alícuotas en tubos independientes incubándose y conservándose a 30 °C durante 7 días.

Se obtuvieron 12 muestras que se sometieron a extracción de ADN, utilizando el kit ZR Fungal/bacterial DNA MiniPrep D6005.

En donde para la amplificación del gen 16S ARNr específico para el género *Spiroplasma*, se utilizaron los primers F28 (5' CGC AGA CGG TTT AGC AGG TTT GGG 3') y R5 (5' AGC ACC GAA CTT AGT CCG ACA C 3') que amplifican un producto de 271 pares de bases.

La mezcla de reacción para realizar la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr por PCR contiene un volumen final de 50 µL (incluyendo 10 µL de Pyro Start™ Fast PCR Master Mix 2X, 32 µL de agua, 1.5 µL del primer F28, 1.5 µL del primer R5, y 5 µL del ADN a analizar). La amplificación se realizó en un termociclador Techne TC-412 bajo el siguiente esquema: desnaturalización 96 °C, 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C/ 60 segundos, 65 °C/ 50 segundos, 72 °C/ 90 segundos y una extensión final a 72 °C/ 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados a través de un fotodocumentador (Figura 4), incluyéndose como cepa control a *S. melliferum* ATCC 33219.

Para corroborar que el producto de 271 pares de bases correspondía al género *Spiroplasma* se realizó la secuenciación de este fragmento, en todas las muestras positivas a *Spiroplasmas*.

A partir de un concentrado de las muestras positivas a *Spiroplasmas* se les realizó microscopía de fuerza atómica con el objetivo de elucidar la microestructura de los *Spiroplasmas*. Se comenzó por centrifugar la muestra a 1,200 rpm por tres minutos y lavándose con agua bidestilada tres veces, para proceder a un filtrado con membranas EMD Millipore® a un poro de 0.8, 0.45 y 0.22 µm, utilizando 4 µL de este último filtrado, para fijarlo en placas de silicio y se procedió a observar al microscopio de fuerza atómica del Centro Universitario de Vinculación, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## 6.5 Producción y extracción de metabolitos

Los metabolitos secundarios se produjeron por triplicado, inoculando por separado una colonia de cada género bacteriano aislado en 5 mL de caldo nutritivo e incubándose a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente 500 µL de este cultivo se colocó en un matraz de 125 mL con 50 ml de caldo nutritivo. Al mismo tiempo, se agregaron 2 mL (4% p/v) de resina adsorbente Amberlite® XAD16 (Sigma), en solución acuosa. La incubación se realizó a temperatura ambiente por 5 días a 180 rpm (Figura 5).



**Figura 5.** Producción y extracción de metabolitos secundarios a partir de *A. mellifera*. Laboratorio de Microbiología ICUAP, 2014.

Al término de los cinco días de incubación, la resina se recuperó por decantación y los metabolitos adheridos a ella fueron eluidos con 20 mL de etanol al 99.9% y concentrados con la ayuda de un rotavapor hasta obtener un mililitro de extracto. Los concentrados se conservaron a -20 °C. De cada uno se obtuvieron dos concentraciones, de 15% y 7.5% (Sierra *et al.* 2012).

## 6.6 Evaluación *in vitro* de la actividad de los extractos contra *Atta mexicana*

Para la evaluación *in vitro* de la actividad de los extractos contra *A. mexicana* se utilizaron ejemplares de hormigas arrieras que fueron obtenidas del hormiguero que se tiene en cautiverio en el laboratorio de Entomología del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La actividad insecticida de los extractos se evaluó considerando la susceptibilidad de la hormiga arriera, al ponerse en contacto con los extractos. Se probaron 7 tratamientos, considerando cuatro extractos, a una concentración de 15%, un tratamiento con etanol al 70%, un control positivo empleando *Aspergillus* sp. y un blanco (sin tratamiento) (Tabla 2). Se realizaron cuatro repeticiones, y se probaron bajo un diseño completamente al azar, por lo que se contó con un total de 28 unidades experimentales (Figura 6), la unidad experimental fue una caja petri con 20 hormigas con alimento (0.15 g de hongo *Leucocoprinus* spp.) (Figura 7). Se aplicaron 285 µl del tratamiento respectivo, mismo que se asperjó sobre las hormigas y se mantuvieron en una cámara de cría de insectos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 10\%$  y fotoperiodo de 12 hrs luz, monitoreándose la mortalidad de los individuos a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas.

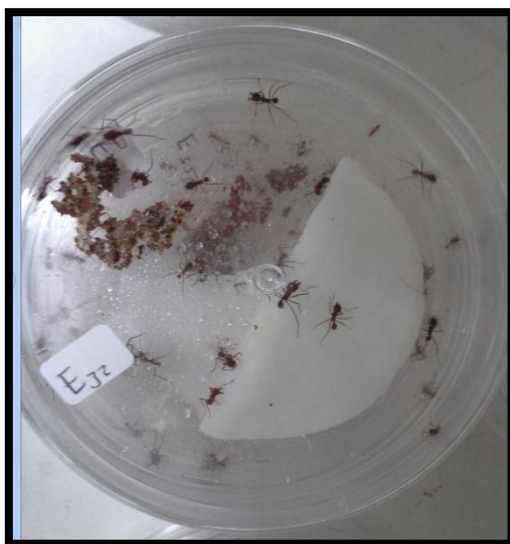
**Tabla 2.** Tratamientos utilizados en el control de *Atta mexicana*.

Tratamiento	Metabolitos secundarios	Concentración
<b>E<sub>1</sub></b>	<i>Pseudomona</i>	15%
<b>E<sub>2</sub></b>	<i>Klebsiella</i>	15%
<b>E<sub>3</sub></b>	<i>Yersinia</i>	15%
<b>E<sub>4</sub></b>	<i>Proteus</i>	15%
<b>C+</b>	<i>Aspergillus</i> sp.	2%
<b>C-</b>	Etanol	70%
<b>BCO</b>	Testigo	--

E<sub>1</sub>: *Pseudomona*, E<sub>2</sub>: *Klebsiella* E<sub>3</sub>: *Yersinia*, E<sub>4</sub>: *Proteus*, C+: *Aspergillus*, C-: Etanol, BCO: Blanco

<b>E<sub>1</sub></b>	<b>BCO</b>	<b>E<sub>1</sub></b>	<b>E<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>3</sub></b>	<b>E<sub>4</sub></b>	<b>C-</b>
<b>E<sub>4</sub></b>	C-	BCO	E <sub>3</sub>	C <sub>2+</sub>	E <sub>4</sub>	C-
<b>E<sub>2</sub></b>	E <sub>3</sub>	BCO	C+	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>4</sub>
<b>E<sub>3</sub></b>	C+	C-	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	C+	BCO

**Figura 6.** Distribución de los tratamientos contra *Atta mexicana* en las unidades experimentales.



**Figura 7.** Evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios en Laboratorio de Microbiología, ICUAP, 2014.

### **6.7 Evaluación *in vitro* de la actividad de los metabolitos secundarios provenientes de *Yersinia* contra *Atta mexicana***

Una vez que se obtuvieron resultados en cuanto a la actividad insecticida por parte de uno de los extractos de metabolitos secundarios procedentes del género *Yersinia*, se estableció un segundo experimento, donde se probaron 5 tratamientos; el extracto de metabolitos secundarios de *Yersinia* a dos concentraciones (15 y 7.5%), un tratamiento con etanol al 70%, un control empleando *Aspergillus* sp. y un blanco (sin tratamiento) (Tabla 3). Se realizaron cuatro repeticiones y se probaron bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones (Figura 8), por lo que se contó con un total de 20 unidades experimentales, donde la unidad experimental fue un micro hormiguero con 20 hormigas con alimento (0.15 g de hongo *Leucocoprinus* spp.) y hojas de árbol de durazno (Figura 9). Se aplicaron 285  $\mu$ l del tratamiento respectivo, mismo que se asperjó sobre las hormigas, y se monitoreó la mortalidad de los individuos a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas.

**Tabla 3.** Tratamientos utilizados en el control de *Atta mexicana*.

Tratamiento	Metabolitos secundarios:	Concentración
<b>E<sub>1</sub><sup>15</sup></b>	<i>Yersinia</i>	15%
<b>E<sub>1</sub><sup>7.5</sup></b>	<i>Yersinia</i>	7.5%
<b>C+</b>	<i>Aspergillus</i> sp.	2%
<b>C-</b>	Etanol	70%
<b>BCO</b>	Testigo	--

E<sub>1</sub>: *Pseudomona*, E<sub>2</sub>: *Klebsiella* E<sub>3</sub>: *Yersinia*, E<sub>4</sub>: *Proteus*, C+:*Aspergillus*, C-: Etanol, BCO: Blanco

<b>E<sup>7.5</sup></b>	<b>C-</b>	<b>E<sup>15</sup></b>	<b>BCO</b>	<b>C+</b>
<b>C-</b>	<b>E<sup>7.5</sup></b>	<b>E<sup>15</sup></b>	<b>C+</b>	<b>BCO</b>
<b>BCO</b>	<b>E<sup>15</sup></b>	<b>C-</b>	<b>E<sup>7.5</sup></b>	<b>C+</b>
<b>E<sup>7.5</sup></b>	<b>C-</b>	<b>C+</b>	<b>BCO</b>	<b>E<sup>15</sup></b>

**Figura 8.** Distribución de los tratamientos contra *Atta mexicana* en las unidades experimentales.



**Figura 9.** Evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios provenientes de *Yersinia* en Laboratorio de Microbiología, ICUAP, 2014.

### **6.7.1 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se evaluaron con análisis de varianza (ANOVA) y su respectiva prueba de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI.

## **6.8 Evaluación *in vitro* de la actividad de los extractos contra *Sitophilus zeamais***

### **6.8.1 Determinación del contenido de humedad en maíz *Cacahuazintle*.**

El cálculo del contenido de humedad consistió en la determinación del agua que contenía el maíz, expresada en porcentaje de masa sobre base húmeda.

Esta determinación se realizó con el objetivo de no alterar mediante la aplicación de los extractos, el contenido de humedad que permite el manejo, conservación y almacenamiento del maíz, que de acuerdo a la norma NMX-FF-034/1-SCFI-2002 (Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - cereales – parte i: maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizado – especificaciones y métodos de prueba), debe ser del 14%.

Se pesó 50 g de maíz en cuatro crisoles y se colocaron en una estufa a  $100 \pm 3$  °C hasta llegar a un peso constante. Las muestras se dejaron enfriar y posteriormente se volvieron a pesar. El porcentaje de humedad promedio se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$H = (m_0 - m_1) * \frac{100}{m_0}$$

Donde;

H: Es el porcentaje de humedad

$m_0$ : Peso inicial

$m_1$ : Peso final

### **6.8.2 Cría de *Sitophilus zeamais***

La cría de *S. zeamais* se estableció en el laboratorio de Entomología del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Para su reproducción se colocaron alrededor de 400 individuos en un envase de plástico de 3 Litros de capacidad con maíz *Cacahuazintle*. El envase fue cubierto por una malla fina para permitir el intercambio de oxígeno y fue colocado en el cuarto de cría a una

temperatura de  $26 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $70 \pm 10$ , en un periodo de 30 días, se obtuvo la primera emergencia que fue utilizada para las pruebas biológicas.

### 6.8.3 Aplicación y evaluación *in vitro* de los extractos sobre *S. zeamais*

La actividad insecticida de los extractos, se evaluó considerando la susceptibilidad de *S. zeamais*, al ponerse en contacto con los extractos. Se probaron 7 tratamientos, considerando cuatro extractos procedentes de *Pseudomona*, *Klebsiella*, *Yersinia* y *Proteus* a una concentración de 15%, un control negativo con etanol al 70%, un control positivo empleando cal viva al 2%, y un blanco (sin tratamiento) (Tabla 4). Se realizaron cuatro repeticiones, y se probaron bajo un diseño completamente al azar con 3 repeticiones, por lo que se contó con un total de 28 unidades experimentales (Figura 10), en donde cada unidad experimental consistió en un vaso de vidrio en el que se depositaron 5 hembras y 5 machos adultos de *S. zeamais* de recién emergencia con 50 g de maíz previamente esterilizado mediante radiaciones en microondas por 3 minutos (Figura 11). Se aplicaron 2 mL del tratamiento respectivo, mismo que se asperjó sobre el maíz, y se mantuvieron en una cámara de cría de insectos a temperatura de  $26 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 10\%$  y fotoperiodo de 12 horas luz; monitoreándose la mortalidad de los individuos a los 5, 10 y 15 días después del establecimiento del experimento.

**Tabla 4.** Tratamientos utilizados en el control de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Extracto de:	Concentración
<b>E<sub>1</sub></b>	<i>Pseudomona</i>	15%
<b>E<sub>2</sub></b>	<i>Klebsiella</i>	15%
<b>E<sub>3</sub></b>	<i>Yersinia</i>	15%
<b>E<sub>4</sub></b>	<i>Proteus</i>	15%
<b>C<sub>1+</sub></b>	Cal Viva	2%
<b>C<sub>1-</sub></b>	Etanol	70%
<b>BCO</b>	Testigo	--

E<sub>1</sub>: *Pseudomona*, E<sub>2</sub>: *Klebsiella* E<sub>3</sub>: *Yersinia*, E<sub>4</sub>: *Proteus*, C<sub>+</sub>: Cal viva, C<sub>-</sub>: Etanol, BCO: Blanco

<b>E<sub>12</sub></b>	<b>E<sub>41</sub></b>	<b>E<sub>14</sub></b>	<b>E<sub>24</sub></b>	<b>E<sub>32</sub></b>	<b>BCO<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>3-</sub></b>
<b>E<sub>33</sub></b>	E <sub>42</sub>	BCO <sub>2</sub>	E <sub>21</sub>	C <sub>2+</sub>	C <sub>1-</sub>	C <sub>4-</sub>
<b>E<sub>31</sub></b>	E <sub>34</sub>	E <sub>13</sub>	C <sub>4+</sub>	BCO <sub>3</sub>	E <sub>23</sub>	E <sub>44</sub>
<b>E<sub>43</sub></b>	BCO <sub>4</sub>	C <sub>2-</sub>	E <sub>11</sub>	E <sub>22</sub>	C <sub>3+</sub>	C <sub>1+</sub>

**Figura 10.** Distribución de los tratamientos contra *Sitophilus zeamais* en las unidades experimentales.



**Figura 11.** Unidades experimentales en el tratamiento contra *Sitophilus zeamais*.  
Laboratorio de Agroecología, ICUAP, 2014.

#### 6.8.4 Mortalidad de los adultos

La mortalidad de los adultos fue un parámetro determinado mediante el conteo de adultos muertos, en tres lecturas durante los días 5, 10 y 15 después de la aplicación de los tratamientos.

El porcentaje de mortalidad fue corregido mediante la fórmula de Abbott (Lagunes, 1994).

$$MC = \frac{X - Y}{100 - Y} (100)$$

Dónde:

MC=Mortalidad Corregida

X=Mortalidad en el tratamiento

Y=Mortalidad en el testigo

### 6.8.5 Pérdida de peso

La pérdida de peso se calculó de acuerdo a la fórmula de coeficiente de daño expresada en porcentaje a partir del peso del maíz dañado y el maíz sano, reportado por Judenko, 1973.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{PS - PD}{PS} (100)$$

Dónde:

PS=Peso promedio de granos sanos

PD=Peso promedio de granos dañados

#### 6.8.5.1 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos de la mortalidad de los adultos y pérdida de peso se evaluaron con análisis de varianza (ANOVA) y su respectiva prueba de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI.

### 6.9 Determinación del perfil proteico

La determinación del perfil proteico de los extractos se realizó una vez que se obtuvieron de colonias únicas, y que fueron probados, corriendo las muestras en geles desnaturalizados de policramida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), a una concentración del 10% y el marcador de peso molecular All Blue (BioRad). Se obtuvo un concentrado de cada uno de los extractos que fue hidratado con 1 mL de agua especializada y se le agregó el colorante de azul de bromofenol, para posteriormente ser introducido en un baño a 100 °C durante 3 minutos. La muestra se cargó en un gel de SDS-PAGE al 10% (34,5:1 acrilamida-bisacrilamida) y se sometió a una intensidad de 40 mV durante 30 minutos para permitir el alineamiento de la muestra y después 150 minutos a 80 mV. El gel fue teñido en una solución 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético glacial y 0.25% de azul de Coomassie durante 120 minutos. El colorante no fijado se eliminó con una solución 15% (v/v) de ácido acético glacial y 20% (v/v) de metanol. Los geles obtenidos se fotografiaron mediante un analizador de imágenes Bio-Imaging Systems, MiniBisPro y seguidamente, se secaron y almacenaron.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Identificación de géneros bacterianos

Las abejas *A. mellifera* aisladas en Santa María Coronango, Puebla, México, mostraron una microbiota conformada por cuatro géneros bacterianos, con predominancia de *Klebsiella* y *Pseudomonas*, seguidos por los géneros *Yersinia* y *Proteus* (Tabla 5). Dichos resultados concuerda con lo reportado por Gilliam (1987), Gilliam *et al.*, (1988) y Gilliam y Taber (1991) cuyos trabajos refieren que las bacterias a la familia Enterobacteriaceae, son los microorganismos más numerosos, presentes principalmente en el tracto intestinal de la abeja.

**Tabla 5.** Géneros bacterianos aislados a partir de *Apis mellifera*.

Género	Porcentaje
<i>Klebsiella</i>	37.50
<i>Pseudomona</i>	31.25
<i>Yersinia</i>	12.50
<i>Proteus</i>	6.25

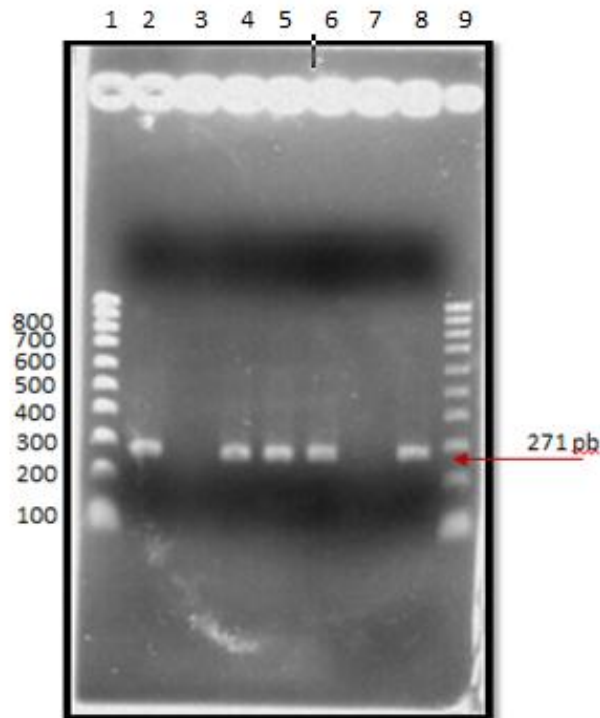
White (1921), cita la microbiota de *A. mellifera*, donde reporta la presencia de *Lactobacillus rigidus apis.*, *Lactobacillus. constellatus* y *Bacillus influzoides apis.* Martinson *et al.* (2011) refiere que la carga bacteriana que presenta la abeja se alberga principalmente en su intestino y se transmite gracias a la sociabilidad de la especie y de acuerdo a Dillon y Dillon (2004), la flora bacteriana distintiva de la abeja puede desempeñar un papel en la salud y vitalidad de estos organismos.

Debido a la importancia de *A. mellifera* y su relevante contribución en agroecosistemas como polinizador natural (Klein *et al.*, 2007, Aizen *et al.*, 2008;), es que las pérdidas recientes de colonias han captado el interés público, sobre todo en países como Estados Unidos y Europa, siendo los lugares donde se reportan las tasas más altas de mortalidad, con promedios que oscilan en un 30 % (Neuman y Carreck, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2012), dichos reportes además sugieren que las razones de este desorden varían por regiones o países y que no pueden ser atribuibles a un solo factor, por lo que los esfuerzos por disminuir las pérdidas deben ser diversos (Spleen *et al.*, 2013). Ante dicha problemática algunos autores mencionan que las mayores pérdidas pueden ser atribuibles a la introducción de plagas y patógenos, por lo que sugieren la necesidad de estudiar y

caracterizar la biota bacteriana de la abeja como una estrategia de buen manejo y conservación de la especie (Heather *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2012; Corby *et al.*, 2014), ya que muchos de los organismos detectados, no solo están relacionados con la digestión y adsorción de nutrientes, sino con efectos patogénicos sobre sus hospederos (Schmid-Hempel, 1998).

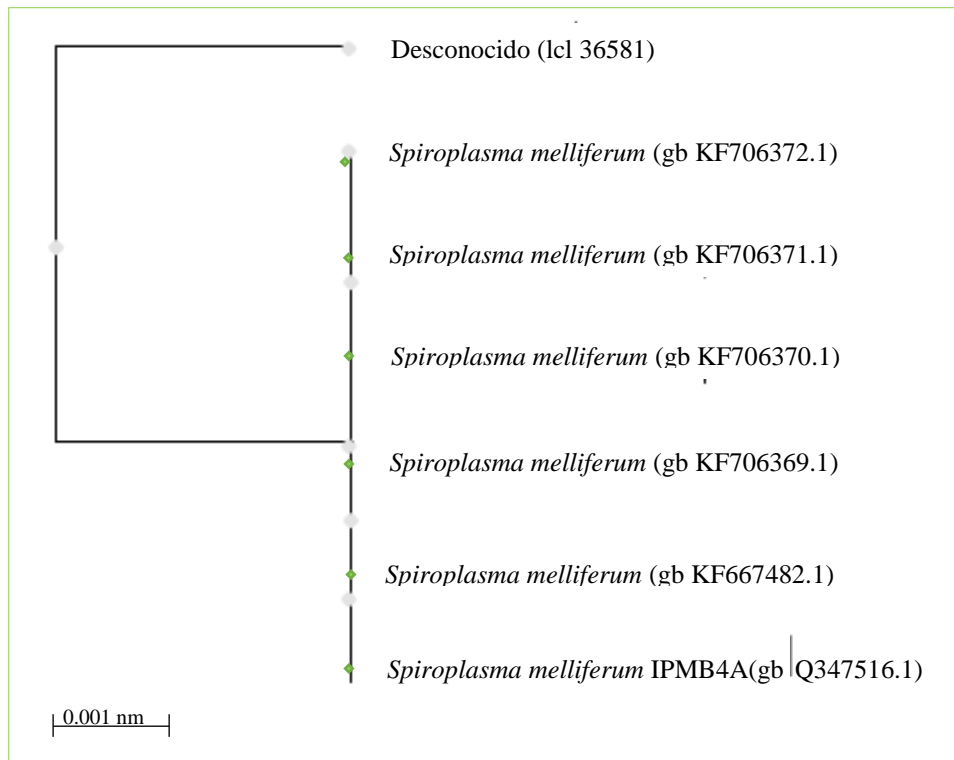
## **7.2 Detección del género *Spiroplasma***

El presente estudio reportó, mediante la amplificación de 271 pb del fragmento del gen 16S ARNr específico para el género *Spiroplasma* por PCR, la presencia de este género en el 38% de los ejemplares de *A. mellifera* provenientes de Santa María Coronango, Puebla, México (Figura 12). Lo anterior concuerda con Mouches *et al.* (1984), cuyos estudios demuestran que los *Spiroplasmas* no forman parte de la biota natural de la abeja, sino que provienen de la superficie de flores y plantas que visitan, y que de acuerdo a Raju *et al.* (1981) y Clark (1982), la transmisión parece ser que ocurre a través de la contaminación fecal en las superficies de las flores de los hospederos infectados. Schwarz *et al.* (2014) soportan esta idea al sugerir que la prevalencia de estas bacterias en las abejas adultas específicamente durante la primavera se debe a la transmisión entre los hospederos. Regassa y Gasparich (2006), mencionan que estos patógenos invaden principalmente el tracto intestinal de las abejas, sin embargo, algunas especies han ampliado su rango de hábitat incluyendo la hemolinfa, ovarios, cuerpo graso, hipodermis y glándulas salivales. *S. apis* y *S. melliferum* son conocidos patógenos de *A. mellifera* (Bóve, 1997; Clark, 1977; Meeus *et al.*, 2012), identificándose como agentes causantes de enfermedades neurológicas en las abejas específicamente durante la primavera utilizando los términos "spiroplasmosis" y "enfermedad de mayo" (Schwarz *et al.*, 2014), por lo que los recientes desafíos relacionados a la conservación y manejo de las abejas, así como la preocupación debida a las pérdidas dramáticas de colonias por diferentes causas como la introducción de plagas y patógenos (Potts *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2011), es lo que ha dado hincapié a la búsqueda y estudio de los posibles agentes patógenos (Cox-Foster *et al.*, 2007; Oldroyd, 2007), como es el caso del género *Spiroplasma*.



**Figura 12.** Gel de Agarosa que muestra la amplificación del gen 16S ARNr, carriles 1 y 9 marcadores, carril 2 control positivo (*Spiroplasma melliferum* ATCC 33219), carril 3 control negativo, carril 4 al 8, muestras problemáticas.

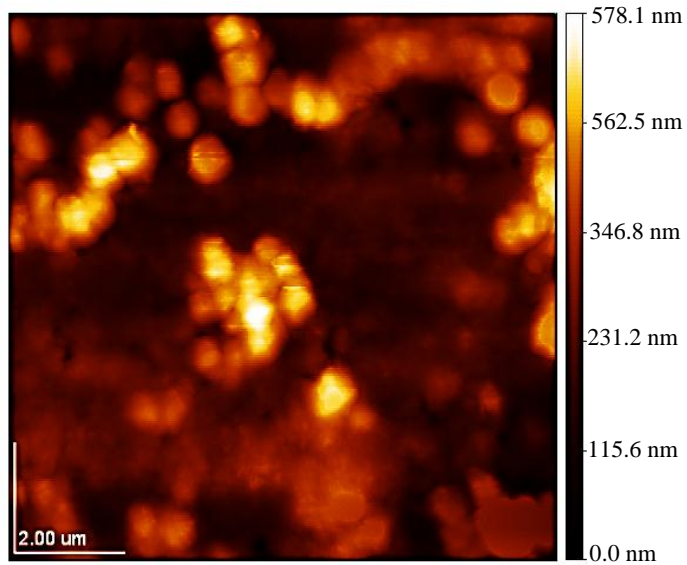
Mediante la secuenciación del gen 16S, el presente estudio demostró de acuerdo al árbol filogenético (Figura 13) y al Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), una similitud (95%) con el gen 16S ARNr de *S. melliferum* (Número del banco de genes: KF706372.1). Lo anterior concuerda con Schwarz *et al.* (2014), quienes refieren en sus hallazgos que el 58.3% de las muestras analizadas en sus estudios fueron infectadas con *S. melliferum*, demostrando una mayor incidencia y estabilidad a lo largo de las estaciones del año que *S. apis*. Filogenéticamente, el género *Spiroplasma* pertenece a la clase de los mollicutes que son bacterias helicoidales, móviles y carentes de pared celular (Gasparich *et al.* 2004). De acuerdo a Whitcomb (1981), algunas especies de *Spiroplasma*s parecen ser comensales inofensivos de insectos, sin embargo algunas otras especies han desarrollado patogenicidad hacia diversos artrópodos y plantas, como es el caso de *S. melliferum* que de acuerdo a Clark (1982), causa infecciones sistemáticas y aumento en la mortalidad de las abejas melíferas.



**Figura 13.** Árbol filogenético, mostrando la relación filogenética entre los miembros del género *Spiroplasma*.

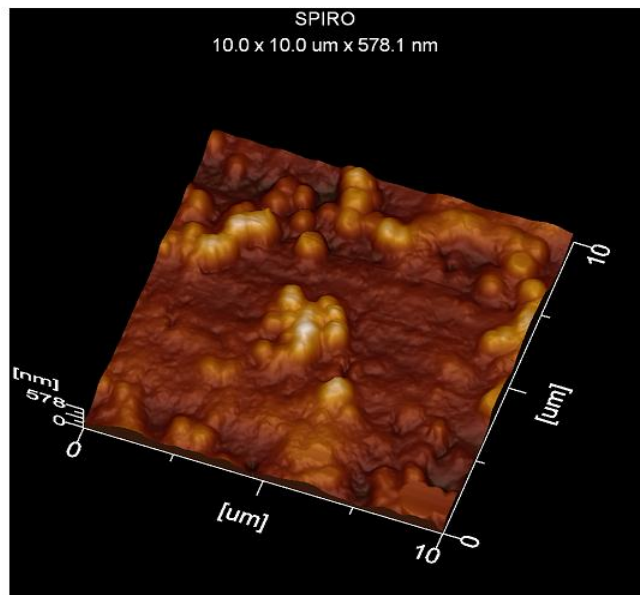
### 7.3 Microscopía de fuerza atómica

El presente estudio permitió elucidar mediante microscopía de fuerza atómica realizada a las muestras positivas a *Spiroplasma*, de los ejemplares de *A. mellifera* provenientes de Santa María Coronango, Puebla, México, una estructura de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.075  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 14 y 15). Dichos resultados concuerdan a lo reportado por Garnier *et al.* (1981) en cuanto a longitud y morfología de los *Spiroplasmas*. Los mismos autores reportan mediante técnicas de microscopía de transmisión estructuras en forma de espiral, que corresponden a la estructura típica de estas bacterias, sin embargo, en estudios recientes se han encontrado estructuras redondeadas, helicoidales e intermedias, con longitudes que varían de 3 a 12  $\mu\text{m}$  y diámetros de 0.1 a 0.35  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 2004) demostrándose que la morfología cambia de acuerdo al hospedero y a las condiciones externas del ambiente (Patel *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 2004). A la luz de los recientes descensos globales de abejas y la gran brecha que existe entre el conocimiento de estos patógenos, debido a la dificultad para ser estudiados mediante métodos convencionales, es que los resultados obtenidos en el presente estudio revelan importante información acerca de estas bacterias de interés en la apicultura dada su asociación con las enfermedades antes mencionadas.



Tamaño de imagen: 10.0 X 10.0 μm, Altura de imagen: 0.578 μm

**Figura 14.** Microscopía de fuerza atómica de muestra positiva a *Spiroplasma* mostrando topografía y morfología, Laboratorio de Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología-BUAP, 2014.



Tamaño de imagen: 10.0 X 10.0 μm, Altura de imagen: 0.578 μm

**Figura 15.** Microscopía de fuerza atómica de muestra positiva a *Spiroplasma* mostrando diferencia de fases, Laboratorio de Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología-BUAP, 2014.

## 7.4 Extracción de los metabolitos secundarios

De la microbiota aislada en los ejemplares de *A. mellifera* provenientes de Santa María Coronango, Puebla, se obtuvieron 4 extractos diferentes, los cuales corresponden a los metabolitos secundarios de *Pseudomona*, *Proteus*, *Yersinia* y *Klebsiella*. Del concentrado de cada extracto se realizaron diluciones con agua destilada y se obtuvieron dos concentraciones finales 15% y 7.5%.

## 7.5 Evaluación *in vitro* de la actividad de los extractos contra *Atta mexicana*

La actividad insecticida obtenida con los diferentes extractos, se evaluó a partir del porcentaje de mortalidad, donde el análisis de varianza con su respectiva prueba de Tukey (Tabla 6), permitió observar a partir de las 48 horas diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el efecto de los demás tratamientos, presentándose 3 grupos de medias, donde el tratamiento con *Yersinia* fue el que mayor mortalidad ocasiono con un 21.25 %, mientras que el tratamiento con *Proteus* fue el tratamiento que menor mortalidad ocasiono (1.25 %). El análisis además permitió observar la prevalencia de esta tendencia a lo largo de todas las mediciones, alcanzando un total de mortalidad por parte de *Yersinia* de 92.5 %.

**Tabla 6.** Evaluación del porcentaje de mortalidad por parte de los tratamientos contra *A. mexicana*

Tx	Porcentaje de mortalidad $\pm$ Error Estándar + Significancia						
	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs	120hrs	144hrs	168hrs
E <sub>1</sub>	2.5 $\pm$ 1.44 a	7.5 $\pm$ 1.44 b	8.75 $\pm$ 1.25 b	27.5 $\pm$ 1.44 b	37.5 $\pm$ 1.44 b	43.75 $\pm$ 1.25 b	65 $\pm$ 0 c
E <sub>2</sub>	1.25 $\pm$ 1.25 a	5 $\pm$ 0 b	8.75 $\pm$ 1.25 b	12.5 $\pm$ 1.44 c	20 $\pm$ 2.04 c	40 $\pm$ 2.04 b	71.25 $\pm$ 1.25 b
E <sub>3</sub>	2.5 $\pm$ 1.44 a	21.25 $\pm$ 1.25 a	31.25 $\pm$ 1.25 a	47.5 $\pm$ 1.44 a	73.75 $\pm$ 1.25 a	76.25 $\pm$ 1.25 a	92.5 $\pm$ 1.44 a
E <sub>4</sub>	1.25 $\pm$ 1.25 a	1.25 $\pm$ 1.25 c	1.25 $\pm$ 1.25 c	3.75 $\pm$ 1.25 d	12.5 $\pm$ 1.25 c	30 $\pm$ 0 c	52.5 $\pm$ 1.44 d
C+	1.25 $\pm$ 1.25 a	6.25 $\pm$ 1.25 b	10 $\pm$ 0 b	12.5 $\pm$ 1.44 c	13.75 $\pm$ 1.25 c	31.25 $\pm$ 1.25 c	53.75 $\pm$ 1.25 d
C-	2.5 $\pm$ 2.5 a	6.25 $\pm$ 1.25 b	8.75 $\pm$ 1.25 b	13.75 $\pm$ 1.25 c	28.75 $\pm$ 1.25 b	42.5 $\pm$ 1.44 b	63.75 $\pm$ 1.25 c
B	0 $\pm$ 0 a	3.75 $\pm$ 1.25 b	7.5 $\pm$ 1.44 b	15 $\pm$ 0 c	32.5 $\pm$ 1.44 b	45 $\pm$ 0 b	70 $\pm$ 0 b

Tx: Tratamientos, E<sub>1</sub>: *Pseudomona*, E<sub>2</sub>: *Klebsiella* E<sub>3</sub>: *Yersinia*, E<sub>4</sub>: *Proteus*, C+:*Aspergillus*, C-: Etanol, B: Blanco.

\*Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

A las 168 h, se observa en la tabla 6 cuatro grupos de medias, siendo el tratamiento a base de *Yersinia* el que presento la mayor mortalidad, y es estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al efecto de los demás tratamientos, como se puede observar el tratamiento blanco presento una alta mortalidad, esto puede deberse a que las hormigas no pueden sobrevivir mucho tiempo sin la reina.

Los resultados obtenidos en la presente investigación relacionados a la actividad insecticida de los metabolitos secundarios del género *Yersinia* aislado de *Apis mellifera*, se puede explicar, ya que existen reportes actualmente se han encontrado cepas de *Yersinia entomophaga* que no muestran toxicidad para seres humanos, pero sí para insectos (Parkhill *et al.*, 2001; Landsberg *et al.*, 2011). De acuerdo a Hurst (2011) la bacteria *Y. entomophaga* MH96, tiene la capacidad de causar mortalidad a través de un amplio rango de especies insectiles, incluyendo los de orden de Coleópteros y Lepidópteros. French-Constant y Waterfield (2005), mencionan que la actividad insecticida de *Y. entomophaga* está determinada por la presencia de un complejo de tóxicas que de acuerdo con French-Constant *et al.* (2007) y Blackburn *et al.* (2011), dicho complejo es encontrado en *Bacillus thuringensis*, conocida bacteria utilizada con éxito en el control de plagas en cultivos. Sin embargo la reciente aparición de insectos resistentes a las tóxicas de *B. thuringensis* (Tabashnik *et al.*, 1993), es una de las principales razones que ha motivado en la búsqueda de nuevas fuentes de biopesticidas, como es el caso de *Yersinia*.

## 7.6 Evaluación *in vitro* de la actividad de los extractos contra *Sitophilus zeamais*

### 7.6.1 Determinación del porcentaje de humedad

En referencia al porcentaje de humedad del grano de maíz que se utilizó para el experimento se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 7).

**Tabla 7.** Porcentaje de humedad en granos de maíz *Cacahuazintle*.

Muestra	Porcentaje de Humedad
<b>Muestra 1</b>	10.6943
<b>Muestra 2</b>	11.3303
<b>Muestra 3</b>	12.2684
<b>Muestra 4</b>	12.0012
<b>Promedio</b>	11.5735

Por lo que el promedio de las cuatro muestras fue de 11.57%, lo cual permitió llevar a cabo la aplicación de los extractos sin alterar el porcentaje de humedad señalado (14%) por la NMX-FF-034/1-SCFI-2002.

### 7.6.2 Mortalidad de los adultos

El análisis de varianza de la mortalidad de los individuos de *S. zeamais*, evaluados a los 5, 10 y 15 días, mostró diferencia significativa entre los tratamientos establecidos, observándose tres grupos de medias y una diferencia significativa por parte del tratamiento con cal viva, al presentar una mortalidad acumulada de 62.5 % (Tabla 8). A su vez, no se observó efecto de mortalidad en *S. zeamais* por causa de alguno de los extractos, lo cual puede deberse a que los extractos al ser asperjados sobre el maíz, no tuvieron contacto directo con los insectos. Lo anterior coincide con lo mencionado por Lagunes (1994) y Rodriguez (2000), cuyas investigaciones están relacionadas al control de *S. zeamais* con polvos vegetales, al referir que los métodos de control son preventivos más que curativos, ya que una vez que el insecto penetra en el grano cualquier polvo vegetal de probada eficacia protectora carece de efecto. Por tanto, el control debe estar enfocado al desarrollo de repelentes, disuasivos de la alimentación u ovipostura, confusores o disruptores, reguladores de crecimiento (Metcalf y Metcalf, 1992; Coats, 1994), así como barreras físicas contra el daño (D'Antonio, 1997).

**Tabla 8.** Porcentaje promedio de mortalidad de adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad $\pm$ Error Estándar + Significancia		
	5 Días	10 Días	15 Días
<b>E<sub>1</sub> (<i>Pseudomona</i>)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b
<b>E<sub>2</sub> (<i>Klebsiella</i>)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b
<b>E<sub>3</sub> (<i>Yersinia</i>)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b
<b>E<sub>4</sub> (<i>Proteus</i>)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b
<b>BCO (Blanco)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b
<b>C+ (Cal viva)</b>	42.5 $\pm$ 2.5 a	62.5 $\pm$ 2.8 a	62.5 $\pm$ 2.8 a
<b>C- (Etanol)</b>	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b

\*Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

### 7.6.3 Determinación de pérdida de peso

La determinación de la pérdida de peso (Tabla 9), mostro una diferencia significativa por parte del tratamiento con cal viva, al presentar una pérdida de peso de 0.27 %, %, y es

estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al efecto de los demás tratamientos evaluados, concordando así con los resultados obtenidos de mortalidad de individuos.

**Tabla 9.** Porcentaje de pérdida de peso en maíz *Cacahuazintle*.

Tratamientos	Porcentaje pérdida de peso $\pm$ Error Estándar + Significancia
<b>E<sub>1</sub> (<i>Pseudomona</i>)</b>	1.36 $\pm$ 0.15 b
<b>E<sub>2</sub> (<i>Klebsiella</i>)</b>	1.31 $\pm$ 0.10 b
<b>E<sub>3</sub> (<i>Yersinia</i>)</b>	1.64 $\pm$ 0.36 b
<b>E<sub>4</sub> (<i>Proteus</i>)</b>	1.31 $\pm$ 0.10 b
<b>BCO (Blanco)</b>	1.25 $\pm$ 0.072 b
<b>C+ (Cal viva)</b>	0.27 $\pm$ 0.03 a
<b>C- (Etanol 70%)</b>	1.23 $\pm$ 0.11 b

\*Prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

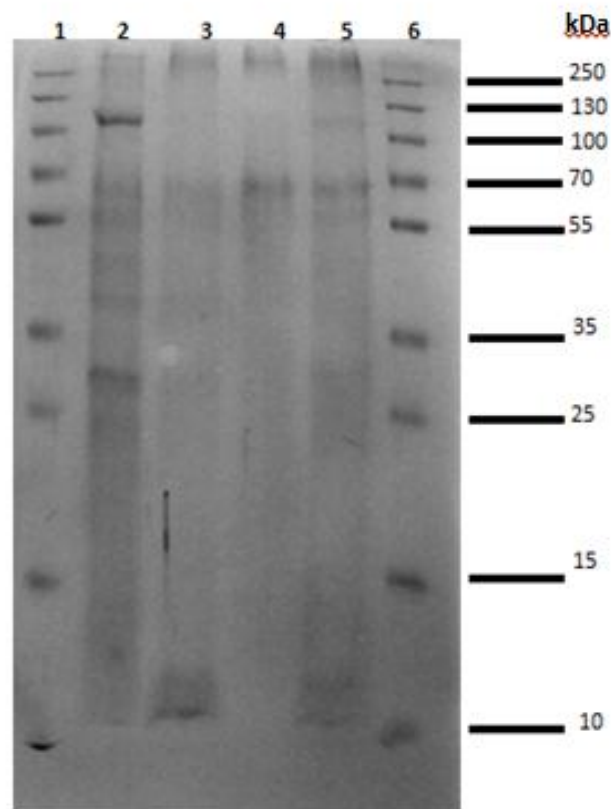
Si bien la cal viva es un mineral inerte, de acuerdo a Silva *et al.* (2004), es un material cuyo modo de acción en el control de plagas como insecticidas de contacto, se debe a que tiene un efecto abrasivo o de absorción de los lípidos de la epicutícula, facilitando la pérdida de agua, causando la muerte del insecto por deshidratación. Y de acuerdo a Ebeling (1970), aquellos que no mueren, al quedar con el polvo adherido al cuerpo, disminuyen su habilidad de apareamiento y reduce la oviposición. De esta forma es que puede considerarse a la cal viva como un método alternativo al uso de insecticidas organosintéticos, al ser económicamente accesible y de bajo riesgo para ser usado por los pequeños y medianos productores (Perez *et al.*, 2007).

### 7.7 Determinación y diversidad de los perfiles proteicos de los extractos

La determinación del perfil proteico se realizó debido a que se consideró que los agentes causales de la toxicidad podrían tener origen proteico, por lo que para la determinación se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), ya que se considera como un método eficaz para la diferenciación de microorganismos (Plikaytis *et al.*, 1986) además de ser una técnica confiable y

comúnmente usada para la separación, identificación y caracterización de proteínas (Wirth y Romano 1995, Steinberg, 2009).

De la determinación de los perfiles proteicos a cada uno de los extractos (*Klebsiella*, *Pseudomona*, *Yersinia* y *Proteus*) provenientes de la biota aislada de *A. mellifera*, se observaron variabilidad en cuanto al número de bandas proteicas, pero mostraron similitud en cuanto a su tamaño, predominando la de peso molecular de 70 kDa, que se observó en todos los perfiles. La banda de peso molecular de 10 kDa coincidió para *Yersinia* y *Pseudomona*, mientras que las bandas de peso molecular 55, 70 y 130 kDa, coincidieron para *Pseudomona* y *Proteus*, siendo este último extracto el que presento el mayor número de bandas (Figura 15).



**Figura 16.** SDS-PAGE al 10% de los extractos de cultivos de *Proteus* (Carril 2), *Yersinia* (Carril 3), *Klebsiella* (Carril 4), *Pseudomona* (Carril 5), Carril 1 y 6, marcador de peso molecular.

### 7.7.1 Actividad insecticida de los aislados.

Se determinó la toxicidad de los cuatro extractos obtenidos procedentes de las cepas identificadas, contra *A. mexicana* y *S. zeamais*, donde sólo el extracto proveniente del género *Yersinia* mostró actividad insecticida contra *A. mexicana*, cuyas bandas proteicas corresponden a un peso molecular de 10 y 70 kDa. Este hecho puede atribuírsele a la presencia de proteínas tóxicas que por el peso molecular pudieran comparársele a algunas de las endotoxinas Cry de *B. thuringensis*, ya que de acuerdo a la literatura se sabe que la actividad insecticida que se le atribuye a la bacteria *B. thuringensis* se debe a su capacidad de producir un cuerpo paraesporal de naturaleza proteica conocido como cristal durante su fase de esporulación. Este cristal proteínico se constituye por endotoxinas conocidas como proteínas Cry o Cyt, siendo algunas de ellas activas contra insectos como lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), ácaros e himenópteros (hormigas), entre otros. El peso molecular de las proteínas Cry oscila entre 25 y 140 kDa (Del Rincón *et al.*, 2006; Iñigo *et al.*, 2006). Actualmente se han clasificado 332 endotoxinas dentro de 47 grupos de proteínas Cry, 22 proteínas Cyt en dos grupos y otras seis proteínas de *B. thuringensis* que no se han clasificado dentro de un grupo específico (Crickmore *et al.*, 1998). Para las toxinas Cry 1 los fragmentos tóxicos pesan entre 60 y 70 kDa, para las Cry 2 el peso molecular de la prototoxina es de 70 kDa, al igual que para la Cry 3, sin embargo difieren en el tipo de formación de los cristales siendo para la Cry 2 cuboidal y romboidal para la Cry 3. Para la Cry 4 se ha encontrado que los fragmentos tóxicos corresponden a pesos moleculares que van de 50 a 70 kDa (King *et al.*, 1996). Los polipeptidos de 70 kDa que corresponden con las endotoxinas Cry tipo 2 asociadas a morfología cubica, son activos tanto para lepidópteros como dípteros (Shneff *et al.*, 1998; Crickmore, 2000; Glare y Callaghan, 2000) pero hasta la fecha, con la excepción de una solicitud de patente de la toxina Cry22 específica para hormiga, ninguna clase de proteínas Cry se ha encontrado que sea directamente tóxica para los insectos himenópteros (De Maagd *et al.*, 2003). De acuerdo a Soberón y Bravo (2007), el modo de acción de las toxinas Cry se observan mediante síntomas que se presentan a partir de la ingesta de los cristales, como son cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general las toxinas Cry forman poros líticos que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana (González *et al.*, 2006). Por tanto si bien lo anterior puede explicar la posible relación que existe entre las proteínas encontradas en el extracto de *Yersinia* con peso molecular de 70 kDa y su toxicidad frente a *A. mexicana*, con alguna de

las endotoxinas de Cry de *B. thuringensis*, ya que actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies bacterianas como *Clostridium bifermentans* (Soberón y Bravo, 2007) no puede asegurarse que se trate de las mismas ya que no se ha comprobado la similitud en cuanto a sus secuencias aminoacídicas, de esta forma puede explicarse la falta de actividad insecticida en los demás extractos que también presentaron bandas con pesos moleculares de 70 kDa. La actividad insecticida presentada por parte del extracto de *Yersinia* sobre la hormiga arriera *A. mexicana*, puede responder a la necesidad de implementar nuevas alternativas biotecnológicas en el combate de plagas que encuadren con un desarrollo agroecológico, sustituyendo así el uso intensivo y sin control de plaguicidas, que ocasionan la generación de resistencia y los ya bien estudiado daños en el ambiente y la salud del ser humano.

## 8 CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron cuatro géneros bacterianos de *A. mellifera*; *Klebsiella* (37.5%), *Pseudomona* (31.2%), *Yersinia* (12.5%) y *Proteus* (6.2%), así como la detección y elucidación mediante microscopía de fuerza atómica la presencia del género *Spiroplasma*, quien mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, mostró una similitud (95%) con el gen 16S ARNr de *S. melliferum* (Número del banco de genes: KF706372.1), conocido patógeno de la especie, que no ha sido reportado con anterioridad en Puebla, México.

Los metabolitos secundarios producidos por *Yersinia* presentaron proteínas con pesos moleculares de 10 kDa y 70 kDa.

De acuerdo a este estudio se logró observar que el extracto de *Yersinia* contiene metabolitos secundarios biológicamente activos contra *A. mexicana* al mostrar un 92.5 % de mortalidad acumulada a una significancia de  $P < 0,05$ .

Los resultados obtenidos permitieron observar actividad insecticida por parte del tratamiento con Cal viva sobre individuos de *Sitophilus zeamais*, al presentar una mortalidad acumulada de 62.5 %, sin embargo no se observó mortalidad por parte de los extractos obtenidos en esta investigación.

## **9 RECOMENDACIONES**

Se recomienda que se realice la determinación de la especie de *Yersinia* que presente actividad insecticida sobre *Atta mexicana*.

Caracterizar e identificar las proteínas de peso molecular de 10 kDa y 70 kDa de *Yersinia* mediante su secuenciación aminoacídica.

Realizar una microscopía de transmisión, a las proteínas de *Yersinia* con el objeto de buscar cuerpos para esporales que pudieran ser comparados a las endotoxinas Cry de *Bacillus thuringensis*.

Se recomienda realizar el análisis de costos de producción y extracción de metabolitos secundarios procedentes de *Yersinia*, como estrategia para desarrollar un paquete tecnológico para uso agrícola.

## 10 LITERATURA CITADA

- Altieri, M.A. Traditional farming in Latin America. *The ecologist*, 1991; **21**:93-96.
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*. 2008; **18**: 1572-1575.
- Altieri, M.A., Nichols, I. El papel Ecológico de la Biodiversidad en la Agricultura. En: Biodiversidad y manejo de plagas en Agroecosistemas. Barcelona: Icaria editorial, 1994; pp. 13-27.
- Altieri, M.A., Nicholls, I. Los impactos Ecológicos de la Agricultura moderna y las posibilidades de una Agricultura verdaderamente Sustentable. En *Agroecología: Teoría y práctica para una agricultura sustentable*. México; Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe, 2000; pp. 113-125.
- Andrews, K., Quezada, J. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: Estado actual y futuro. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, 1989; 623 p.
- Arango, J.A., Romero, M., Orduz, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Microbiology*. 2002; **92**: 466-474.
- Arias, C., Dell'orto, H. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Santiago Chile, FAO/INIA, 1983; 67 p.
- Arienilmar, A.L., Da Silva, L.R., Faroni, D.A., Guedes, N.C., Martins, J.H., Pimentel, A.G. Modelos analíticos do crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* em trigo armazenado. *Engenharia Agrícola Ambiental*. 2005; **10**:155-161.
- Bertorelli, M.V., Montilla, J., Hernandez, J. Efecto de la defoliación por hormigas cortadoras de hojas (*Formicidae: Attini*) sobre el rendimiento de la yuca (*Manihot esculenta* CRANTZ). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 2006; **23**:310-318.
- Bio-mériux. API 20E Sistema de identificación para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram-negativos. No. 20100. Francia, Biomériux S.A. 1989; 24 pp.

- Blackburn, M.B., Martin, P.A.W., Kuhar, D., Farrar, R.R., GundersenRindal, D.E. The occurrence of Photorhabdus-like toxin complexes in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*. 2011; **6**:1-7
- Bianchi, F.J., Booij, C.J., Tscharntke, T. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceeding of the Royal Society of London*, 2006; **273**:1715-1727.
- Bové, J.M. Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1997; **109**:14-15.
- Bravo, M.H. Combate de la hormiga arriera. *Fitófilo (DGDA, SAG) XII(24)*:16-21.
- Casida, J.E and G.B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future. *Annual Review of Entomology*. 1959; **43**:1-16.
- Caffarini, P., Carrizo, P., Pelicano A., Roggero, P., Pacheco, P. Efectos de extractos acetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (ricino), *Melia azedarach* (paraíso) y *Trichillia glauca* (trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundii*). *IDESIA*. 2008; **26**:59-64.
- Clark, T.B. *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1977; **29**: 112-113.
- Clark, T.B. Spiroplasmas: diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships. *Science*. 1982; **217**: 57–59.
- Coats, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review Entomology*. 1994; **39**:489-515.
- Colwell, R.R. Fulfilling the promise of biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2002; **20**:215-228
- Corby, H.V., Maes, P., Anderson, K. E. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *Plos One*. 2014; **9**: 1-13.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 2007; **318**: 283–287.

- Crickmore, N. The diversity of *Bacillus Thuringensis* delta-endotoxins. En: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application* (ed. J. F. Charles, A. Delecluse y C. Nielssen-LeRoux), Kluwer Academic Plublisher, Dordrecht, 2000; pp. 41-46.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998; **62**: 807-813.
- D'Antonio, L. Principais pragas de graos armazenados. In Armazenamento de graos e sementes nas propiedaes rurais. XXVI Congreso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Campina Grande. Paraiba, Brasil, 1997; pp. 189-291.
- De Maagd, R., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*. 2003; **37**: 409–433.
- Della, L..Hormigas de importancia económica en la región Neotropical,. En: Introducción a las hormigas de la Región Neotropical. (: Fernández F., ed. ). Bogotá, Colombia; Instituto Humboldt, 2003; pp 337-349.
- Del Rincón, C., Méndez, J., Ibarra, J. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticidahacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*(Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*. 2006; **45**:157-164.
- Demain, L., Elander, P. The b-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999; **75**:5–19.
- Demain, L., Fang, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2000; **69**:1-39.
- Demain, L., Sanchez, S. Microbial Drug Discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 2009; **62**:5-16.
- Dillon, R., Dillon, V. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*. 2004; **49**:71–92.

- Ebeling, W. 1971. Sorptive dust for pest control. *Annual Review of Entomology*. 1971; **16**: 123-158.
- Echazarreta, G. Cajero, A. Las acciones continuas y diversas que se implementan para controlar la varroasis y la africanización ocasionan aumento en los insumos y los costos de producción. Memorias del Foro Mesoamérica ante el Tercer Milenio. 2002; pp 45-54.
- Escobar, D., García, C., Rentería N.Y., Neita, M. Manejo y control de hormiga arriera (*Atta* spp & *Acromyrmex* spp) en sistemas de producción de importancia económica en el departamento del Chocó. Cartilla 1 y 2. Ministerio de Agricultura-PRONATTA-Universidad Tecnológica del Chocó. CO, 2002; 53 p.
- French-Constant, R.H., Waterfield, N.R. An ABC guide to the bacterial toxin complexes, In: Advances in applied microbiology (Laskin AI, Bennett JW, Gadd GM, and Sariaslani S, ed). San Diego CA: Elsevier Academic Press Inc, 2005; pp. 169 –183.
- French-Constant, R.H., Dowling and N.R. Waterfield. Insecticidal toxins from *Photobacterium* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon Journal Elsevier*. 2007; **49**: 436–451.
- Földes, T., Bányai, I., Herpai, Z., Varga, L., Sziget, J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; **89**: 840-846.
- Fowler, H., Bernardi, J., Delabie, C., Forti, L.C., Pereira-Da-Silva, V. Major ant problems of South America. In: Applied Myrmecology; a world perspective (Vander Meer R. K., K. Jaffé and A. Cedeno, ed). Boulder Colorado, USA: Westview Press, 1990; pp: 3-14.
- García, S., Romero, T., Orduz, P. Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actualidades biológicas*. 2012; **34**: 5-19.
- Garnier, M., Clerc, M., Bové, M. Growth and division of spiroplasmas: morphology of *Spiroplasma citri* during growth in liquid medium. *Journal of Bacteriology*. 1981; **147**: 642–652.

- Gasparich E. Spiroplasmas: evolution, adaptation and diversity. *Frontiers in Bioscience*. 2002; **7**: 16-40.
- Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J., Williamson, D.L. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; **54**: 893-918.
- Gilliam, M. Microbial Ecology of honeybees. Proc XXXIth International Apicultural Congr. Warsaw. Apimondia Publ House, Bucharest, 1987; 217-220.
- Gilliam, M., Taber, S. Diseases, pests, and normal microflora of honeybees (*Apis mellifera*) from feral colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1991; **58**: 286-289.
- Gilliam, M., Lorenz, B.J., Richardson, G.V. Digestive Enzymes and microorganism in honeybee (*Apis mellifera*): influence of streptomycin, age, season and pollen. *Microbios*. 1988; **55**: 95-114.
- Glare, T., Callaghan, M. *Bacillus Thuringensis*: Biology, Ecology and Safety, John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra. 2000, 368 p.
- González, C., Farino's, G., Caccia, S., Díaz, M., Castañera, P., Leonardi, G., Giordana, B., Ferre, J. Toxicity and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins in the Mediterranean Corn Borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; **72**: 2594-2600.
- Gruber, A.K., Valdivia, J.K. Control de *Atta* spp. con prácticas agrícolas e insecticidas botánicos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 2003; **67**: 87-90.
- Hadacek, F., Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis Journal*. 2000; **11**: 137-147.
- Heather, R., Rios, D., Walker-Sperling, V., Roeselers, G., Newton, I. Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and

- Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *Plos One*. 2012; **7**: 1-11.
- Helmuth, W. Manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana, Imprenta MOSSAICO, 2000; pp 1-9.
- Hurst, R.H, Jones, S.A., Binglin, T., Harper, L. A., Jackson, T. A., Glare, T.R. The main virulence determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects. *Journal of Bacteriology*. 2011; **193**:1966–1980.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Prontuario de información municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Corononango Puebla. 2009. Consultado 01-04-2015 en <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21034.pdf>.
- Iñigo, R., Estela, A., Porcar, M., Martínez, C., Oguiza, J., Ferré, J., Caballero, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry 1 Protein Toxic to Insects of the Family Noctuidae, Tortricidae, Putellidae and Chrysomelidae. *Applied Environmental Microbiology*. 2006; **72**: 4796-4804.
- Jacas, J., Caballero, P. Avilla, J. El control biológico de plagas y enfermedades. Publicaciones de la Universitat Jaume I. 2005; pp 14-17.
- Jeyaprakash, A., Marjorie, A., Hoy, M., Allsopp, M. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera* capensis and *Apis mellifera* scutellata (Insecta:Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2005; **84**:96–103.
- Judenko, E. Analytical method for assessing yield losses caused by pest on cereal crops with and without pesticides. Trp. Pest. Bull. No. 2 center for averseas pest research. Hull printers Ltd. England. 1973, pp 31.
- Kacániová, M., Chlebo, R., Kopernicky, M., Trakovická, C. Microflora of the Honeybee Gastrointestinal Tract. *Folia Microbiology*. 2004; **49**: 169-171.
- Katz, E., Demain, L. The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible role. *Bacteriological Reviews*. 1977; **41**: 449-474.

- King, L., Wong, G., Rodríguez, C., Luna-Olvera, H. Avances Recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringensis*. Universidad de Nuevo León. 1996; pp. 64-68.
- Klein, A., Vaissie`re, B., Cane, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S., Kremen, C. Importance of crop pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing papers of a Biological character*. 2007; **274**:303–313.
- Lagunes, T.A. Extractos, polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del fríjol en la agricultura de subsistencia”. Memorias del Colegio de Postgraduados, en: Usaidconacyt-boruconsa. Efectos toxicológicos de cuatro plantas sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1855 (coleoptera: curculionidae) y sobre el gorgojo de las galletas *Stegobium paniceum* (Linnaeus 1761) (coleoptera: anobiidae) en Perú, Guyana, 1994; **69**:234-240.
- Landsberg J.M., Jones, A.S., Rothnagel, R., Busby, N.J., Marshall, S.D., Simpson, M.R., Lott, J.S., Hankamer, B., Hurst, M.R. 3D structure of the *Yersinia entomophaga* toxin complex and implications for insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; **108**: 20544-20549.
- Liu, C.H., Zou, W.X., Lu, H., Tan, R.X. Antifungal activity of *Artemisa annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*. 2001; 88:277-282.
- Maes, J. M., Mackay, W. P. Catálogo de las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Nicaragua. *Revista Nicaragüense de Entomología*. 1993; **23**: 1-46.
- Manzi, L.V., Mayz, J.C. Valorando los microorganismos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2003; 23:85-88.
- Martinson, V., Danforth, B., Minckley, R., Rueppell, O., Tingek O., Moran, N. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*. 2011; **20**: 619-28.

- Martinson, V., Moy, J., Morán, N. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied Environment Microbiology*. 2012; **78**: 2830-2840.
- Meeus, I., Vercruyse, V., Smagghe, G. Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012; **109**: 172-4.
- Metcalf, C.L., Flint, W.P. Insectos destructivos e insectos útiles. México, CECSA, 1976; 1208p.
- Metcalf, R.L., Metcalf, E.R. Plant Kairomones in Insect Ecology and Control. Chapman and Hall. New York. USA. 1992; 169 pp.
- Meehan, T.D., Werling, B.P., Landis, D.A., Gratton, C.. Agricultural landscape simplification and insecticide use in the Midwestern United States. Proceeding of the National Academy of Science U S A, 2011; 108:11500-11505
- Mouches, C., Bové, J.M., Albisetti, J.. Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in southwestern France. *Annals of Microbiology (Inst. Pasteur)*. 1984; **135A**:151–155.
- Nathan, S. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: *Culicidae*). *Bioresource Technology*. 2006; **98**: 1856-1860.
- Neumann, P., Carreck, N. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 2010; 49: 1-6.
- Oldroyd, B.P. What's killing American honey Bees? *Plos Biology*. 2007; **5**: 1195–1199.
- Omura, S. The search for bioactive compounds from microorganisms."Fungicides and antibacterial agents". (Okuda, S., Tanaka, Y. Brock Springer Series, ed) in *Contemporary Bioscience*, 1992; pp 213-243.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels,

- K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001; **413**:523-7.
- Patel, K., Mayberry-Carson, K., Smith, P. Effect of External Environmental Factors on the Morphology of *Spiroplasma citri*. *Journal of Bacteriology*. 1978; **133**: 925-931.
- Pérez, A. Lucha biológica contra la bibijagua (*Atta insularis* Güerin). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Laboratorio de Manejo de Plagas. La Habana, CU, 2002; pp 191-206..
- Pérez, F., Silva, G., Tapia, R. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 2007; **42**:633-639.
- Pérez, N., Vázquez, L.L. Manejo ecológico de Plagas. En: F. Funes; L. García; M. Bourke; Nilda Pérez; P. Rosset (eds), Transformando el campo cubano: Avances de Agricultura sostenible. ACTAF-CEAS-Food First. La Habana, Cuba. 2001; p.191.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*. 2010; **49**: 15–22.
- Plikaytis, B.D., Carlone, G.M., Plikaytis, B.B. Numerical analysis of normalized whole-cell protein profiles after sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology*. 1986; **132**:2653-2660.
- Pushpalatha, E., Muthukrishnan, J. Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes, *Journal of Applied Entomology*. 1999; **123**:369-373.
- Raju, B.C., Nyland, G., Meikle, T., Purcell, A.H. Helical, motile mycoplasmas associated with flowers and honey bees in California. *Canadian Journal of Microbiology*. 1981; **27**:249–253.
- Regassa, L.B., Gasparich, G.E. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Frontiers in Bioscience*. 2006; **11**: 2983–3002.
- Rojas, F.P.. Las hormigas del suelo en México: diversidad, distribución e importancia (*Hymenoptera: Formicidae*). *Acta Zoológica Mexicana*. 2001; **1**:189-238.

- Sánchez, E. Control biológico de plagas de las abejas. Instituto Politécnico Nacional. 2003
- Schmid-Hempel P. Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton, NJ, 1998; 392 p.
- Schwarz, R.S., Teixeira, E. W., Tauber, J.P., Brike, J.M., Martins, ., M.F., Fonseca, I., Evans, J.D. Honey bee colonies act as reservoirs two spiroplasma facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiologyopen*. 2014; **28**: 1-15.
- Shoji J. Recent chemical studies on peptide antibiotic from the genus Bacillus. *Advances, Journal of Applied Microbiology*. 1978; **24**:187-214
- Shneff, E., Crickmore, N., Van, R., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal cristal proteins. *Microbiology Molecular Biology Review*. 1998; **62**: 775-806.
- Sierra, G., Romero, T., Orduz, P. Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas en suelo. *Actualidades Biológicas*. 2012; **34**: 5-19.
- Silva, G., González, P., Hepp, R., Casals, P. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes. *Agrociencia*. 2004; **38**:529-536.
- Silva, G., Orrego, R., Tapia, M. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2005; **40**:11-17
- Soberón, M., Bravo, A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 2007; **14**: 303-314.
- Spleen, M., Lengerich, E., Renich, K., Caron, D., Rose, R., Pettis, S., Henson, M., Wilkes, T., Wilson, M., Stitzinger, J., Lee, K., Andree, M., Synder, R., vanEngelsdorp, D. For the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*. 2013; **52**: 44-53.
- Steinberg, T.H. Protein gel staining methods: An introduction and overview. *Methods in Enzymology*. 2009; 463: 541-563.

- Tabashnik, B.E., Finson, N., Johnson, M.W., Moar, W.J. Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* causes minimal cross-resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; **59**:1332–1335.
- Tasao, R., Romanchuk, E., Peterson J., Coats, R. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the tree of heaven (*Ailanthus altissima* L.). *Bio Med Central Ecology*. 2002; **2**:1-8.
- Thomashow, S., Weller, M. Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites. *Plant-Microbe Interactions*. 1996; **1**:187-235.
- Throne, J. Life history of immature maize weevils (*Coleoptera: Curculionidae*) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. *Environmental Entomology*. 1994; **23**:1459–1471.
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*. 2011; **50**: 1–10.
- vanEngelsdorp, D., Caron, D., Hayes, J., Underwood, R., Henson, M., Rennich, K., Spleen, A., Andree, M., Snyder, R., Lee, K., Roccasecca, K., Wilson, M., Wilkes, J., Lengerich, E., Pettis, J. For The Bee Informed Partnership. A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*. 2012; **51**:115-124.
- Vergara, R. Artrópodos plagas de los granos, semillas y derivados almacenados (Guías Talleres Prácticos Entomología Económica No. 8). Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 1994; 18 p.
- Vergara, R., Yepes, F., Saldarriaga, M.. Talleres sobre manejo integrado de plagas y enfermedades. Medellín: Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional. . 2000; 103 p.
- Wang, W., Chen, J., Du, K., Zaikun, X. Morphology of spiroplasmas in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tremor disease. *Research in Microbiology*. 2004; **155**: 630-635.

- White, P. The normal bacterial flora of the honeybee. *Journal of Pathology Bacteriology*. 1921; **24**: 64-72.
- Williams, I.H. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews*. 1994; **6**:229–257.
- Wirth, P., Romano, A. Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods. *Journal of Chromatography*. 1995; **698**: 123-143.
- Whitcomb, R.F. The biology of *Spiroplasmas*. *Annual Review of Entomology*. 1981; **26**:397-425.

## Spiroplasmas Detection in Isolates of *Apis mellifera* in Puebla-Mexico

F. Badillo<sup>1</sup>, A. Rivera<sup>1,2\*</sup>, O. Romero<sup>1,3</sup>, A. Aragón<sup>1,3</sup>,  
M. Huerta<sup>4</sup>, R. Santellan<sup>2</sup> and E. Reyes<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Degree in Sustainable Agroecosystem Management,  
Autonomous University of Puebla, Mexico.

<sup>2</sup>Center for Research in Microbiological Sciences, Autonomous University of Puebla.

<sup>3</sup>Center for Agroecology, Autonomous University of Puebla, Mexico.

<sup>4</sup>University Department of Sustainable Development, Autonomous University of Puebla, Mexico.

<sup>5</sup>Applied Research Laboratory of the University Center for Bonding,  
Autonomous University of Puebla, Mexico.

(Received: 29 May 2014; accepted: 16 July 2014)

Mollicutes are the smallest organisms capable of autonomous self-replication, and their phenotype differs from that of other bacteria in their lack of a cell wall. Mollicutes are wide spread in nature and pathogenically infect humans, other mammals, reptiles, arthropods and plants. Normally demonstrate a strict specificity to a host, as well as tissue specificity, which result from an obligate parasitic lifestyle. However, plant pathogens, including phytoplasmas, spiroplasmas and achleplasmas, have the capability to infect a variety of plants and use insect-host vectors for transmission. The objective was detection and characterization of spiroplasmas by PCR, sequencing 16S rRNA, and atomic force microscopy, in isolates of *Apis mellifera* in Puebla-Mexico. Samples from 100 honey bee were collected and examined by PCR, sequencing 16S rRNA and atomic force microscopy. A 271 bp product was produced from the F28/R5 primer set in 38%. Alignment of the sequences showed a 95% similarity with *Spiroplasma melliferum*. Atomic force microscopy study shows the presence of spherical structures formed chains with sizes within the ranges reported for spiroplasmas.

**Key words:** *Apis mellifera*, spiroplasma, vector, PCR, AFM.

---

Spiroplasmas are prokaryotes belonging to the class Mollicutes and their traditional host are plants and insects. Due to their small cell size spiroplasmas can pass through 0.22 µm filters used in filter sterilization. Spiroplasmas are difficult to detected with light microscopy and cultivation. They are also impractical to use for detection of pathogens at low densities from fields samples<sup>1,2</sup>.

The spiroplasmas organism showed stable vertical transmission through successive generations of the host, and exhibited negative effects on growth, reproduction, and longevity of the host, particularly in older adults<sup>3</sup>.

The ecology of the spiroplasmas must be studied, and principal host or alternate host or both must be identified, should be of importance to agriculture or public health or as a basic microbiological model. Some spiroplasmas cause female-biased sex ratios of their host insects as a result of selective death of the male off spring during embryogenesis<sup>3,4</sup>.

---

\* To whom all correspondence should be addressed.  
E-mail: jart70@yahoo.com